

硫酸铜对斑马鱼发育毒性和运动能力的影响

杨树君, 轩振, 安连超

牡丹江医科大学公共卫生学院, 黑龙江 牡丹江

收稿日期: 2024年11月18日; 录用日期: 2024年12月14日; 发布日期: 2024年12月19日

摘要

目的: 完成研究内容, 测定不同浓度硫酸铜对斑马鱼发育毒性和运动能力的影响, 阐述斑马鱼对环境水体铜离子压力的敏感程度。方法: 第0天收集鱼卵, 第3天配制药, 第3天开始给药至第7天。空白组, 低剂量组, 中剂量组, 高剂量组, 每组三个平行实验组。从给药开始拍照记录。统计幼鱼存活率。实验中需要应用恒温、恒湿和程序光照控制培养体系培育斑马鱼, 鱼卵收集和孵化孵化箱、体式显微镜和显微镜及运动跟踪摄像、分析系统, 显微镜观察斑马鱼形态变化。结果: 本实验中硫酸铜会对斑马鱼幼鱼造成全身性损伤且96 h实验组中均有斑马鱼幼鱼死亡, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的组中斑马鱼幼鱼的存活率为60%, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的组中斑马鱼幼鱼的存活率为36%, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的组中斑马鱼幼鱼的存活率为15%, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组中的斑马鱼幼鱼的存活率为0%。结论: 本实验硫酸铜对斑马鱼幼鱼具有致死的毒性且会影响其运动能力, 中硫酸铜对斑马鱼的安全毒性范围是0.1~0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在安全毒性的范围之内进行炎症损伤的探索。本实验中72 h, 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的组中斑马鱼全身性炎症损伤最明显。

关键词

硫酸铜, 斑马鱼, 铜离子毒性

Effects of Copper Sulfate on Developmental Toxicity and Locomotor Performance in Zebrafish

Shujun Yang, Zhen Xuan, Lianchao An

School of Public Health, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang Heilongjiang

Received: Nov. 18th, 2024; accepted: Dec. 14th, 2024; published: Dec. 19th, 2024

Abstract

Objective: To complete the study, to measure the effects of different concentrations of copper

文章引用: 杨树君, 轩振, 安连超. 硫酸铜对斑马鱼发育毒性和运动能力的影响[J]. 水产研究, 2024, 11(4): 225-234.
DOI: [10.12677/ojfr.2024.114026](https://doi.org/10.12677/ojfr.2024.114026)

sulfate on the developmental toxicity, and exercise ability of zebrafish and to elaborate the sensitivity of zebrafish to copper ion pressure in environmental water. Methods: Fish eggs were collected on day 0, pharmaceutical was dispensed on the third day, and dosing was started on the third day until the seventh day. The control group low dose group, high dose group. Take a photo recording from the beginning of dosing. Statistics on juvenile survival rates. In the experiment, it is necessary to use constant temperature, constant humidity and programmed light control culture system to cultivate zebrafish, fish egg collection and hatching incubators, stereo microscopes and microscopes, motion tracking cameras, analysis systems, and microscopes to observe the morphological changes of zebrafish. Outcome: In this experiment, copper sulfate can cause systemic damage to zebrafish juveniles, and all zebrafish juveniles died in the 96-hour experimental group, The survival rate of zebrafish juveniles in the 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group was 60%, The survival rate of zebrafish juveniles in the 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group was 36%, The survival rate of juvenile zebrafish in the 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group was 15%, The survival rate of zebrafish juveniles in the 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group was 0%. Conclusion: In this experiment, copper sulfate is lethally toxic to zebrafish larvae and affects their motility. The safe toxicity range of copper sulphate to zebrafish is 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Inflammatory damage is explored within the range of safe toxicity. In this experiment, 72 hours, the systemic inflammatory damage of zebrafish was the most obvious in the 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group.

Keywords

Copper Sulphate, Zebrafish, Copper Ions Toxicity

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

近年来，随着工业和农业需求的增长，金属被应用于相应的领域。其中，铜作为工业生产的重要原材料之一，同时也在农业生产中广泛用作饲料、肥料和农药。但是铜残留的部分会经过污水处理等方式最终流入自然的水体中，污染了自然水环境，给水生生物带来了危害。人类接触铜的多样性，其中一部分是通过食物链不断传入人体内，另一部分被植物根部所吸收最后变成食物进入人体[1]。当人体内累计了一定浓度的铜时，会导致人体内部环境的失衡，影响人体功能[2]。本实验以斑马鱼为模型研究硫酸铜对其发育影响和运动能力的影响。最新的研究指出，铜的体内毒性研究表明对特定实验规格的大小鼠进行周期性灌胃给药，结果表明对鼠的肝、肾、肺都造成严重的损伤并显示出明显的生理异常[3]。此外，纳米铜的毒性机制包括氧化应激、芬顿效应、溶酶体的特洛伊木马机制。因此，水体中过量铁和铜不仅构成环境污染，也可通过生物的吸收和蓄积，经食物链对人类健康构成威胁。铜作为一种重金属元素，它在生态系统中既不能被分解，也不能被完全消除[4]。近年来应用繁殖快的水生动植物来进行生物学监测，以达到检测水体中金属离子的浓度变化。本实验主要研究的目的是探究 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，这四种不同浓度的硫酸铜溶液对斑马鱼发育毒性和运动能力的影响。

斑马鱼因其胚胎透明、养殖便利、操作简单和观察方便等多种优点，被广泛应用在毒理实验领域，因此被视为一种模型生物。斑马鱼幼鱼在金属离子环境下表现出对金属离子的高度敏感[5]。斑马鱼是一种源自于印度东部的淡水硬骨鱼，体长约 3 cm，因为其身体表面具有类似斑马一样的纵向相间条纹，所以被人们叫做斑马鱼[6]。斑马鱼与人类基因组相似度高达百分之 87。斑马鱼以其体型精小、便于喂养、胚胎透明、发育迅速、不受季节因素的影响且繁殖能力强更符合动物实验 3R 原则，实验动物的伦理问题也是实验过程中重要的一环[7]。同样的实验目地、实验方案，对于所选取的实验动物特别关键。目前，

基因编辑、转基因、遗传诱导等实验技术已成功在斑马鱼模型中得以应用，研究员们通过这些实验手段发现了数以千计的基因，并且证明了其基因功能[8]。这些研究发现使得斑马鱼不仅在生物学，在临床医学、环境毒理学等都得到了实际的应用。斑马鱼作为模式生物具有体型小巧、易于饲养、胚胎透明、发育周期短且繁殖能力强的优势，斑马鱼组织器官发育与哺乳动物在发育起源及过程等方面都有较高同源性[9]。本实验的意义是通过发育毒性和运动能力改变对铜离子暴露的关系，为应用斑马鱼对水体铜离子污染提供依据。阐明发育毒性和运动能力改变对铜离子暴露的关系，将为应用斑马鱼检测水体污染提供科学依据。

胆矾是一种深蓝色的晶体化合物，又名硫酸铜。其溶解于水和酒精，暴露在空气时便与水蒸气反应，形成水合物。在多个工业领域，硫酸铜都有广泛的应用，同时也可用作保护农作物。硫酸铜在不同的领域具有广泛的用途，因其溶解性高、溶解速度快，同时具有强大的杀菌功能，可以作为优质的农药杀菌剂、灭草剂和杀虫剂。另外，硫酸铜还具有预防鱼病的功效，硫酸铜主要用于杀灭纤毛虫、钟形虫、轮虫及其他一些裂头蚴[10]。为避免硫酸铜的分解和失效，需在水温 60 度的条件下使用非金属容器溶解硫酸铜[11]。当使用硫酸铜颗粒时，要充分溶解，避免颗粒的存在，确保鱼只饮用清澈的水。当养殖斑马鱼容器的体积很大时，饲养斑马鱼的水温有所不同，禁止将硫酸铜颗粒直接泼洒进容器中，应该每 4 隔小时分进行投入。不可以中午水温较高时加入硫酸铜，防止出现斑马鱼中毒死亡的现象，应该在下午 16 时进行给药。相同的容器重复加入硫酸铜，会导致 Cu^{2+} 的含量快速升高，从而抑制饵料生物的生长，对斑马鱼的肝、肾、肠等器官的相应毒害效应，影响斑马鱼的进食和生长，因此尽量避免长期使用硫酸铜[12]。硫酸铜是一种重要的化工原料，是铜盐生产的必要材料，染剂工业生产中的关键是生产船底防污漆，印染厂工业生产中作为染剂，在医药行业中作为聚合剂，在有机化学工业生产上作为生成香辛料和染料中间体的金属催化剂。若硫酸铜勿入口腔，会导致肠道受到刺激，引起恶心干呕、灼热感等不适反应，进而可能出现呕血，对肾脏功能造成损害。这种物质还可能导致老年健忘症，同时对眼睛和皮肤产生明显刺激，长期接触可引起间接性皮肤炎和消化系统不适。

使用基于孔板的斑马鱼幼鱼急性毒性测试方法代替标准的成鱼急性毒性测试方法是否可行，仍需更多数据的支持。从现有的文献资料看，使用 12 天的幼鱼或许能更敏感地检出化学物质对斑马鱼的急性毒性，但需要进一步验证已知的神经毒性物质。据研究显示，金属铜的释放会导致斑马鱼的存活率的下降，同时对斑马鱼胚胎造成严重的畸形[13]。斑马鱼遭受铜毒性，表现为视神经的损伤[14]。随着科技的进步，铜正被广泛应用于医学领域，这是基于其出色的物理性质[15]。此外，还需要对测试条件的具体细节进行规范化研究。斑马鱼试验目前还没有普及使用自动化设备，而市面上的图像自动分析系统价格较高，这在很大程度上限制了斑马鱼高通量测试方法在毒性测试中的应用[16]。高通量在科研实验中非常重要，对于同样一个实验方案，如果采用经济快速的流程可以得到预期的实验结果就没有必要浪费资源进行更复杂的实验流程。以鼠为例，一对健康可生育的实验鼠一次产卵的数量和周期均是斑马鱼的几十分之一甚至是几百分之一。达到实验高通量的效果不仅是实验动物需要改善，未来需要大力开发更实用的自动化设备和图像分析系统，从而提升斑马鱼高通量毒性测试的效率。尽管目前的形态学指标可以直观地表征化学物质对斑马鱼发育的损伤，但是要更敏感地检出化学物质的发育毒性，需要发展更精细的甚至分子或者信号通路的测试指标[17]。尽管当前存在一些挑战，斑马鱼高通量毒性测试方法仍具备广泛的应用场景。在我国正在进行的新污染物治理行动中，特别是在挖掘大量新污染物、尤其是污染场地的污染物中存在高毒性物质方面，斑马鱼的高通量毒性测试方法预计能起到关键性作用。本实验的作用是可以利用斑马鱼的高通量测试方法对大批化学物质或新型污染物进行毒性筛查，随后按照毒性水平进行优先级排序，从而提高新型污染物筛查评估效率[18]。随着斑马鱼高通量毒性测试方法不断的完善和发展，它在化学物质毒性筛查和风险评估中的重要性将不断增强[19]。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

本实验所需的材料与仪器(如表 1 所示)。

Table 1. Instruments and equipment

表 1. 仪器设备

仪器名称	型号	厂家
荧光体式显微镜	Leica M165C	广州市明美光电技术有限公司
24 孔板	/	洁特生物过滤 Biofil
斑马鱼交配盒	/	上海海圣生物实验设备有限公司
十厘米培养皿	/	洁特生物过滤 Biofil
电子天平(十万分之一)	ES225SM-DR(E)	瑞士普利塞斯
移液器 200~1000 ml	/	北京大龙
恒温培养箱	LRH 系列	上海一恒
五水硫酸铜	/	北京化工
野生型斑马鱼	/	/

2.2. 实验方法

2.2.1. 溶液配制

用斑马鱼的养殖水为溶剂，在 1.5 mL 的 EP 管中加先加入 1 mg 的五水硫酸铜粉末再加入 1 mL 养殖水，充分震荡摇匀作为原始溶液，根据所需的浓度再稀释成不同浓度的实验组浓度。

2.2.2. 实验流程

- 1) 毒性安全性设置空白组，0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL，每组分别需要 30 条幼鱼，每组分别设置三组平行实验，以上方案重复三次，在恒温恒湿的环境中从幼鱼孵育第 3 天给药至第 7 天。立即换药至 96 h，每次换药后记录斑马鱼幼鱼的存活数。
- 2) 全身毒性设置空白组，0.1 μg/ml、0.4 μg/ml，每组 30 条鱼，每组分别设置三组平行实验，以上方案重复三次，从幼鱼孵育第 3 天给药至第 6 天，即换药至 72 h 拍照记录结果。
- 3) 硫酸铜对斑马鱼幼鱼运动能力的实验方法为，在安全毒性范围内，加药后观察幼鱼的运动状态和应激反应；加药后，每隔 24 h 在体式显微镜下观察幼鱼的生理形态是否改变。

2.2.3. 统计分析

$$\text{存活率} = \frac{\text{存活数}}{\text{总数}} \times 100\% \quad (\text{公式 1})$$

3. 实验结果

3.1. 硫酸铜对斑马鱼存活率的影响

在同一时间内使用不同浓度硫酸铜的情况下，观察斑马鱼的存活数量，如表 2 所示。每个实验组有三个平行实验组，每一组有三十条斑马鱼。空白组，24~96 h 斑马鱼的存活数为 30 条；0.5 μg/mL，24 h 斑马鱼存活数为 30 条，48 h 斑马鱼的存活数为 26 条，72 h 斑马鱼的存活数为 23 条，96 h 斑马鱼存活数为 18 条；1 μg/mL，24 h 斑马鱼存活数为 30 条，48 h 斑马鱼存活数为 24 条，72 h 存活数为 18 条，96 h

斑马鱼存活数为 11 条; 2 $\mu\text{g/mL}$, 24 h 斑马鱼存活数为 30 条, 48 h 斑马鱼存活数为 21 条, 72 h 斑马鱼存活数为 17 条, 96 h 斑马鱼存活数为 5 条; 4 $\mu\text{g/mL}$, 24 h 斑马鱼存活数为 25 条, 48 h 斑马鱼存活数为 16 条, 72 h 斑马鱼存活数为 9 条, 96 h 斑马鱼存活数为 0 条。

Table 2. The number of zebrafish survived at different times and concentrations
表 2. 不同时间不同浓度斑马鱼存活数

时间/组别	Control	硫酸铜 0.5 $\mu\text{g/mL}$	硫酸铜 1.0 $\mu\text{g/mL}$	硫酸铜 2.0 $\mu\text{g/mL}$	硫酸铜 4.0 $\mu\text{g/mL}$
	10	10	10	10	8
24 h	10	10	10	10	8
	10	10	10	10	9
	10	8	8	7	5
48 h	10	9	7	6	5
	10	9	9	8	6
	10	8	6	5	2
72 h	10	7	5	5	2
	10	8	7	7	5
	10	6	4	0	0
96 h	10	6	3	2	0
	10	6	4	3	0

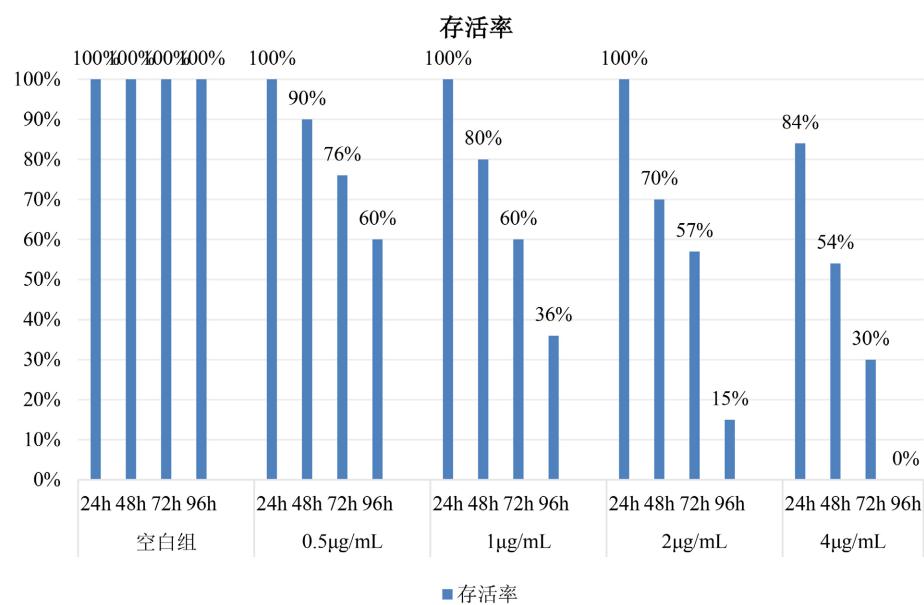


Figure 1. Zebrafish survival rate

图 1. 斑马鱼存活率

由图 1 可知, 空白组的斑马鱼幼鱼从 24 h 到 96 h 的存活率均为 100%; 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的组, 24 h 的斑马鱼幼鱼存活率为 100%, 48 h 存活率为 90%, 72 h 存活率为 75%, 96 h 存活率为 61%; 1 $\mu\text{g/mL}$ 的组, 24 h 的斑马鱼幼鱼的存活率为 100%, 48 h 至 96 h 斑马鱼幼鱼的存活率逐渐下降, 96 h 斑马鱼幼鱼的存活率

为 37%； $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的组，24 h 的存活率为 100%，48 h 至 96 h 斑马鱼幼鱼的存活率逐渐下降，96 h 斑马鱼幼鱼的存活率为 16%； $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的组，24 h 斑马鱼幼鱼的存活率为 100%，48 h 至 96 h 斑马鱼幼鱼的存活率为 0%。由图一可知，48 h 至 96 h，四组实验组中斑马鱼幼鱼的存活率随着时间的延长均降低，与前三组相比 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组的硫酸铜的毒性较强一些。在预实验的过程中，经过三次相同的条件实验后发现， $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 是硫酸铜对斑马鱼的安全毒性范围的上限。在安全的毒性范围之内进行下一步的炎症损伤的探索。

3.2. 硫酸铜对斑马鱼中性粒细胞分部的影响

观察在同一浓度下，随着时间的延长斑马鱼损伤部位中性粒细胞的分布(如图 2)，空白组 24 h 至 72 h 荧光标记的中性粒细胞集中分布在斑马鱼的血液循环系统中，因为空白组的斑马鱼幼鱼没有暴露在硫酸铜溶液中，硫酸铜没有对斑马鱼幼鱼造成毒性损伤。与空白组相比较 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的组中 24 h 至 72 h 的中性粒细胞遍布在斑马鱼幼鱼的全身，随着暴露在硫酸铜溶液中的时间不断增加，从而导致全身性损伤不断增多，所以 72 h 体式显微镜下观察到斑马鱼幼鱼体内荧光相较于 24 h 更明显。 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的组比 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的组中性粒细胞的分布更加明显，因为硫酸铜的浓度越高对斑马鱼的炎症损伤越重。因为中性粒细胞是免疫细胞的一种，当机体出现损伤时，中性粒细胞会聚集在受伤的部位，机体损伤越重，中性粒细胞聚集的越多。

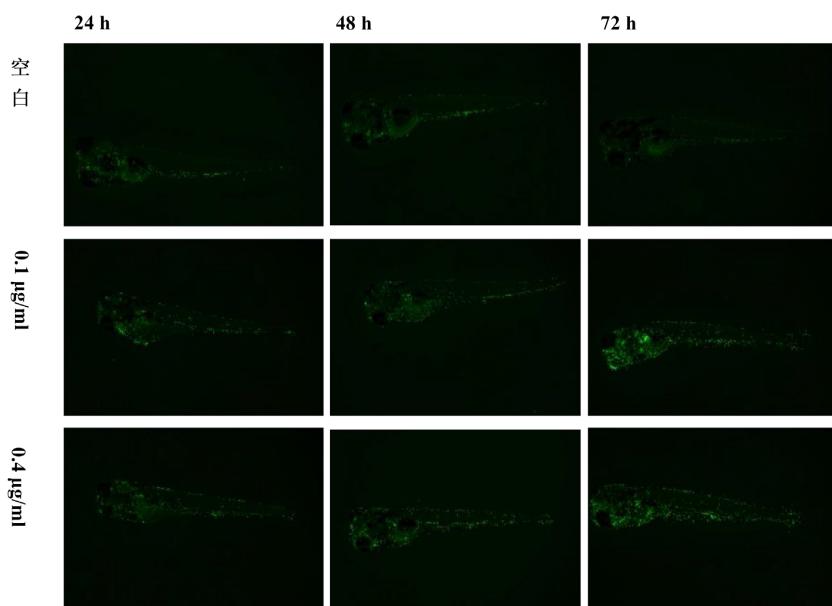


Figure 2. Neutrophil segment diagram under fluorescence stereomicroscope
图 2. 荧光体视显微镜下中性粒细胞分部图

3.3. 硫酸铜对斑马鱼运动的影响

Table 3. Zebrafish athletic ability

表 3. 斑马鱼运动能力

浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	存活数	存活率	活动迟钝	背脊扭曲
0	30	100%	-	0
0.1	30	100%	+	0
0.4	30	100%	++	10%(3/30)

在不同浓度的情况下，观察斑马鱼运动的能力(如表 3)，在实验过程中发现，与空白组相比较， $0.4 \mu\text{g/mL}$ 的浓度中的斑马鱼的反应能力最差、运动最迟缓并且斑马鱼背脊扭曲的含量占 10%。 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 的组中，斑马鱼的运动能力与空白组相比较，受到了抑制；与 $0.4 \mu\text{g/mL}$ 相比，较活跃。

4. 讨论

4.1. 选择斑马鱼为炎症模型的原因

本实验选择斑马鱼为模型。因为目前已经被认可的模型动物有鼠、兔、狗等哺乳动物，同时斑马鱼作为一种水生生物是当前新兴起的一种模型，人们发现一些炎症模型在哺乳动物身上研究耗时耗力，但在斑马鱼凭借着便宜易操作等优点被用作多种炎症模型。目前的实验中，斑马鱼的炎症模拟主要采用以下三种方式，分别是经过断尾诱导的局部炎症、使用脂多糖诱导的全身炎症和硫酸铜诱导的急性炎症[20]。据研究指出，芬尼太炎症模型可被视为一种对斑马鱼产生神经毒性的炎症模型，导致其心脏和神经受到损伤，这种影响需要进一步探讨，尤其对孕妇避免潜在毒性具有一定的借鉴意义[21]。斑马鱼断尾炎症模型是一种创伤性炎症模型，进行斑马鱼尾部断尾处理可引发尾部局部损伤，激活斑马鱼免疫细胞的免疫应答。在斑马鱼发育的早期阶段，伤口处的巨噬细胞和中性粒细胞数量在斑马鱼断尾后的 6 h 达到巅峰，而随后 6 小时内炎症反应开始逐渐减弱[22]。因此，评价药物处理是否可以逆转由脂多糖诱导的免疫细胞增多，成为衡量其抗炎活性的重要指标之一[23]。斑马鱼硫酸铜炎症模型是一种急性炎症模型，通常由硫酸铜诱导。铜在斑马鱼的先天免疫系统中扮演着重要的作用，通常诱导氧化应激等途径积极调节炎症反应。在斑马鱼的幼鱼和成鱼中，硫酸铜刺激导致斑马鱼免疫细胞快速移动到神经丘，从而促使炎症特征的诱导和模拟[24]。相较于物理损伤和感染剂方法，铜作为致炎剂在操作时采用的是无创方法。通过免疫细胞向神经丘的迁移来实现细胞的回流，进而评估药物的抗炎活性[25]。

4.2. 采用 24 孔板毒性试验的优点

在 2013 年，经济合作与发展组织发布了测试指南，针对斑马鱼胚胎进行急性毒性测试。斑马鱼胚胎急性毒性测试采用了一种新的方法，即在 24 孔板中暴露特定细胞期的胚胎于受试物[26]，然后观察胚胎在受精后 48 小时和 96 小时的死亡情况，并计算半数死亡浓度，以评估测试物的急性毒性。通过与基于成鱼的鱼类急性毒性试验相比，该方法有效地简化了实验的流程，并提高了实验效率，被建议作为传统的鱼类急性毒性试验的有效替代。目前一般认为，斑马鱼胚胎和成鱼在毒性试验中表现可能不同，可能是因为毒物在实验材料中的动力学过程存在差异，导致胚胎摄取和代谢毒物的能力可能较弱，从而对毒性损害可能不敏感。有一种看法认为，斑马鱼胚胎对神经毒素的抵抗力较强，这可能与其呼吸功能的不完善有关，而成鱼的呼吸系统对神经毒素很敏感，可能导致缺氧甚至死亡。以目前的情况来看，基于孔板的斑马鱼胚胎急性毒性试验可能并非理想的替代方法。鉴于此，有研究人员开始关注可以在孵化器中培养的幼鱼，这些幼鱼能提供更好的毒性试验替代方案。研究表明在 3 至 8 天斑马鱼幼鱼进行药物的 48 小时和 96 小时急性毒性试验，并将结果与胚胎和成鱼数据进行对比，结果显示幼鱼对急性毒性的敏感性更接近成鱼。本实验所用的方法也是孔板毒性测试，选用中性粒细胞标记的斑马鱼幼鱼，置于 24 孔板中[27]。

4.3. 斑马鱼模型在实际中的应用

斑马鱼是近些年新兴的实验动物模型，其与哺乳动物具有相似的基因组及经济等优势被人们选中，在研究人类疾病和研究新药做出巨大贡献。在由于斑马鱼与人类的遗传信息相似，同时神经系统也有相似之处。据研究显示，斑马鱼和人类都含有丰富的多巴胺、胆碱等激素，其脑组织同样进行了功能区域

的划分，表现出学习、睡眠等行为[28]。最近研究心血管疾病更加细致深入，其中敲除斑马鱼的载脂蛋白 E 基因，这对研究动脉粥样硬化的模型很有帮助。一项研究指出，载脂蛋白 E 基因与极低密度脂蛋白和胆固醇等的代谢息息相关，而斑马鱼的载脂蛋白 E 基因的氨基酸序列与人类的相似，这为高脂血症模型的建立和降脂药物的研发提供了可能。在斑马鱼体内，尿酸的含量在第五天达到了最高的水平，五天后，尿酸酶开始作用，促使尿酸快速代谢。科学研究揭示，摄入过多的黄嘌呤钠盐，会导致尿酸的合成增加。斑马鱼高尿酸的模型中显示，苯并咪唑林可能干扰黄嘌呤代谢，从而降低尿酸的生成。目前，斑马鱼已广泛运用于药理学、发育学和环境毒理学等领域的研究，得益于其成本低廉、高效率等优势，颇受学者欢迎。斑马鱼的不同发育阶段涵盖了多样的评价指标，展现出其发育过程的复杂性。随着科学技术的不断进步，转基因技术在斑马鱼实验中的应用变得更加广泛。金属离子对斑马鱼造成的全身毒性实验显示，转基因荧光斑马鱼因毒素作用而发生变化，特别是通过这种方式监测水中重金属、环境毒性和综合毒性等方面，取得了显著的成果，引起了广泛的应用。斑马鱼模型在研究老年人骨质疏松的方向也有重大的成果，随着年龄的增长，生命体的各项功能会严重退化。对于脊柱动物而言，骨是机体构成的重要框架，人体会因为缺钙、缺乏维生素 D 导致骨折，但是骨细胞的变性及失活也是影响骨健康什么重要的一点。斑马鱼模型在短期内可以得到大量的实验用鱼，研究缓解骨质疏松的药物以及探索免疫因子作用的机制已经被人们广泛关注。

4.4. 硫酸铜对斑马鱼及其它水生生物发育的影响

斑马鱼的活动受多个系统的共同作用，包括中枢神经和免疫系统[28]。当斑马鱼接触有毒物质时，会引发相应的生理变化，进而影响其内部不同的功能系统，如消化系统和免疫系统，从而影响其运动能力。研究指出黑质在斑马鱼的运动中扮演关键的角色，同时黑质细胞的退化和多巴胺不足也是帕金森病的主要诱因。斑马鱼受到中枢系统的调节，与此同时氧化应激也对其运动能力产生重要影响。氧化应激反应是机体内活性氧的含量失衡导致的。据研究显示，当斑马鱼体内的活性氧超过正常水平时，会触发氧化应激反应，这种反应可能破坏 DNA 并导致蛋白表达的异常，从而影响斑马鱼的运动能力。研究表明[29]，当斑马鱼持续暴露在铜离子中运动能力会下降，并且导致体内出现氧化应激现象，进一步导致斑马鱼的运动感知能力的损伤。在斑马鱼体内积聚的金属铜，会对其运动神经系统产生不利的影响，使其运动能力受损。硫酸铜不仅影响鱼类的生长发育，还影响水环境中贝类、虾类的生长发育，抑制蓝藻的生长，调节某些菌类的平衡。当硫酸铜过量时，会抑制水生生物的呼吸、导致水体中氧气与二氧化碳的失衡。

5. 结论与展望

5.1. 结论

如图 1 所示，本实验在 24 h 至 96 h 斑马鱼分别在暴露在 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸铜溶液后会呈现出威胁生命的毒性反应，且在相同的时间随着硫酸铜浓度越高对斑马鱼的生命危害越严重。有学者研究表明斑马鱼暴露于多种污染物，在相同的时间，随着污染物浓度的增加，斑马鱼的死亡率随之增加[30]。本实验中硫酸铜对斑马鱼的安全性毒性范围为 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，在这两个浓度下 72 h 观察到，硫酸铜对斑马鱼造成明显的全身性炎症损伤。如图 2 所示，在荧光显微镜下观察到相同的时间，硫酸铜的浓度越高，对斑马鱼的损伤越明显；相同的浓度，随着暴露时间的增加，对斑马鱼的损伤越明显。同时如图 2 所示，本实验中暴露在 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的硫酸铜中的斑马鱼会出现脊背弯曲的情况。有学者研究表明暴露在多种金属污染物中，相同的浓度时对斑马鱼的损伤程度会有差异，随着污染物浓度的增加，对斑马鱼的损伤会加重，同时相同条件下斑马鱼的各个机能部位对于不同金属污染物的敏感程度也会有差异[31]。

5.2. 展望

科技的不断进步推动了人们的生产和生活方式，也导致了许多对环境造成污染的物质的产生。城市和工业排放的废水中含有许多复杂的金属成分，种类和含量变化繁多。实验结果显示，将斑马鱼幼鱼暴露在污水处理厂的污水中短暂的时间后，他们的生理形态发生明显的改变，包括运动能力和脊柱形态都会出现异常。斑马鱼作为一种新兴的模型动物，有着广阔的发展空间且可以创造经济效益。斑马鱼模型已经出现在我国的太空实验站，斑马鱼被我国选中作为进入太空实验室的动物之一，有着其独特的优势，在太空实验室中已经观察到了，当斑马鱼的心脏物理性受损，经过一段时间后，竟然奇迹般的愈合并进行正常的心脏功能。现如今，斑马鱼已经成为深入研究斑马鱼模型的器官发育和细胞生长等试验为了人类更好适应太空环境。此外国内已经进行了大量关于金属污染物对斑马鱼的影响的研究，但对斑马鱼体内毒素作用机理的认识仍需深入。

参考文献

- [1] 甘露青, 荣菡, 杨丹, 等. 斑马鱼对铜、铅和镍的生物富集动力学研究[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(11): 25-29.
- [2] 杨雅茹, 钟瑶, 李帅东, 等. 水产品中重金属对人体的危害研究进展[J]. 农业技术与装备, 2020(10): 55-56.
- [3] 张永兴, 林默, 王蕾. 纳米氧化铜的应用及其生态毒性研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2024, 63(1): 1-12, 126.
- [4] 章强, 辛琦, 强丽媛, 等. 铜及其与四环素的联合暴露对斑马鱼胚胎的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(5): 35-46.
- [5] 邢延奕. 斑马鱼 *dishevelled* 家族基因调节胚胎图式形成和原肠运动的突变分析[D]: [博士学位论文]. 济南: 山东大学, 2018.
- [6] 彭伟, 张文娟, 薛钰. 斑马鱼作为骨骼疾病模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 248-253.
- [7] 岳勤霏, 刘默, 范欣生, 等. 模式生物斑马鱼模型在方药研究中的应用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(7): 2173-2178.
- [8] 陈佳乐, 曹秋香, 曹慧, 等. 荧光转基因斑马鱼 Tg(ttn.2: EGFP)的构建[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1804-1814.
- [9] 马智慧, 刘慧茹, 丛媛青, 等. 利用模式动物斑马鱼构建中药抗缺氧活性快速评价模型[J]. 山东中医药大学学报, 2024, 48(2): 210-216.
- [10] 王昀, 方彰胜. 水产动物常规检查与诊断在鱼病防治中的应用[J]. 科学养鱼, 2024(1): 51-53.
- [11] 刘彦, 宋锦. 硫酸铜在水产养殖上的应用[J]. 内陆水产, 2002, 28(2): 27.
- [12] 徐超, 姚雨霖, 宋继红, 等. 蔡普生与 Cu~(2+) 对斑马鱼胚胎的联合毒性影响[J]. 浙江工业大学学报, 2024, 52(2): 230-236.
- [13] 罗紫蝶, 郭少娟, 曾晨, 等. 镉暴露对斑马鱼胚胎发育的毒性效应研究[J]. 环境科学与技术, 2022, 35(5): 1315-1322.
- [14] 唐颖, 王丹, 彭星宇, 等. 氯化镉对斑马鱼幼鱼视网膜发育的影响[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(3): 418-429.
- [15] 王予顿. 纳米塑料颗粒对斑马鱼幼鱼的毒性机制研究[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津理工大学, 2023.
- [16] 王成金, 吕琳, 张玉琳, 等. 斑马鱼中高通量毒性测试方法研究进展和应用现状[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(6): 60-67.
- [17] 向定涛. 复合碳纳米材料电化学传感器的构建及其在水中铅和镉检测中的应用[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 武汉科技大学, 2023.
- [18] 姜丽, 赵巍巍, 柳莹, 等. 利用斑马鱼神经行为学毒性特征评估外源性重金属镉暴露的健康风险[J]. 现代畜牧科技, 2023(9): 10-12.
- [19] 夏青, 臧晓涵, 王勇澄, 等. 模式生物斑马鱼在化妆品功效评价中的应用进展及发展趋势分析[J]. 山东科学, 2024, 37(2): 36-46.
- [20] 段秀英, 马瑞娇, 张云, 等. 斑马鱼炎症模型及其在中药抗炎领域的应用[J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1573-1580.

-
- [21] 王斌杰, 付立斌, 叶昕宇, 等. 芬太尼对斑马鱼幼鱼的心脏和神经毒性及机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(10): 767-773.
 - [22] 陈雪平, 夏龙飞, 李晓敏, 等. 斑马鱼实验模型在生物活性评价中的应用[J]. 今日药学, 2024, 34(5): 387-400.
 - [23] 邓爱平. 硫熏对含 α, β -不饱和羰基化合物中药的质量影响[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国中医科学院, 2022.
 - [24] 夏源, 王春瑜, 李姿毅, 等. 铅锰联合暴露致斑马鱼发育神经毒性及 JNK 表达变化[J]. 环境与职业医学, 2023, 40(5): 583-588.
 - [25] 彭新生. 一种酰化胶原蛋白、酰化胶原蛋白制剂及其应用[P]. 中国专利, CN202311241251.4. 2024-04-05.
 - [26] 许晨, 覃兰雪, 徐挺, 等. 扑热息痛对斑马鱼发育与运动行为效应的影响[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(5): 85-93.
 - [27] 宋志慧, 孙欣欣, 李捍东. 氯代酚类物质对斑马鱼的急性毒性及 QSAR 研究[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(12): 20-24.
 - [28] 王宇, 黄宜宁, 刘子陶, 等. 模式生物斑马鱼在重金属神经发育毒性的应用进展[J]. 毒理学杂志, 2021, 35(4): 340-345.
 - [29] 何锦, 薛永来, 周磊, 等. 几类常见污染物对斑马鱼运动影响的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(2): 19-28.
 - [30] 廖耿泽. 铅镉复合暴露对斑马鱼幼鱼运动行为昼夜节律的影响及机制[D]: [硕士学位论文]. 广州: 南方医科大学, 2019.
 - [31] 殷丽. 污染物暴露对斑马鱼的行为毒性及其响应规律分析[D]: [硕士学位论文]. 济南: 山东师范大学, 2016.